

COMPARAÇÃO DA ANÁLISE BACTERIOLÓGICA COM A IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* EM TECIDOS DE AVES

Lana Flávia Baron¹, Germana Vizzotto Osowski², Clarissa S. L. Vaz³, Daiane Voss-Rech⁴,
Sabrina Castilho Duarte³, Ana Paula Almeida Bastos³

¹Graduanda em Farmácia pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC, lanaflaviabaron@hotmail.com

²Graduanda em Biologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus Joaçaba, bolsista CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves

³Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: salmonelose, avicultura, infecção persistente.

INTRODUÇÃO

Salmonelas aviárias podem ser divididas em dois principais tipos (tíficas e paratíficas), com base na biologia da infecção. A maioria dos sorovares de *S. enterica* é capaz de infectar as aves, geralmente colonizando o trato gastrointestinal inferior (5). Nem todos os sorovares vão desencadear o mesmo processo de resposta na ave infectada. Existem diferenças quanto aos mecanismos dos sorovares que são mais ou menos adaptados ao hospedeiro (1-3,5). *Salmonella* spp. infecta as células que revestem a camada epitelial do intestino delgado e grosso, como as células M, enterócitos, células calciformes e podem atravessar esta barreira através de diferentes mecanismos para invadir a própria lâmina. Depois de atingir a lâmina própria da mucosa intestinal, a *Salmonella* spp. invade e persiste no interior dos macrófagos, assim podendo se disseminar para afetar muitos órgãos (4). Embora a persistência bacteriana seja uma fase chave do ciclo de vida de um patógeno e represente uma oportunidade para o controle da doença, muito pouco se sabe sobre como o patógeno sobrevive por longos períodos no hospedeiro. Para estudar os mecanismos desconhecidos utilizados pela *Salmonella* spp. para persistir nas aves e rastrear a sua rota no hospedeiro, é um grande desafio obter marcação de forma confiável em secções histológicas de diferentes órgãos e tecidos. O objetivo desse trabalho foi comparar a marcação de *Salmonella* spp. em tecidos com parafina de aves infectadas com *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium* com o isolamento microbiológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três grupos de aves de postura, SPF (*SpecificPathogenFree*). As aves foram alojadas em isoladores de pressão positiva. Os grupos foram classificados em grupo controle não desafiado (CN), grupo infectado com *S. Heidelberg*(SH), e o terceiro grupo infectado com *S. Typhimurium*(ST). Com 26 semanas de idade, os grupos SH e ST foram inoculados por via oral e sete dias pós-infecção (dpi) as aves foram abatidas por desarticulação cervical, necropsiadas e colhidos fígado, baço, duodeno e ceco para análises laboratoriais. Os tecidos para teste bacteriológico foram submetidos à metodologia convencional de pré-enriquecimento, enriquecimento e isolamento de *Salmonella*. Foram consideradas positivas colônias incolores com um ponto preto central no ágar XLT4 (Xilose Lisina Tergitol 4) e no ágar VB (Verde Brilhante) considerou-se coloração rosada e com halo avermelhado. Foi selecionada uma colônia por placa que possuía as particularidades compatíveis com o patógeno e foi semeada em TSA (Ágar triptico de soja) para a realização das provas bioquímicas e após, identificação antigênica pela técnica de aglutinação rápida em lâmina. Os tecidos utilizados para reações de imuno-histoquímica foram fixados em formalina a 4% e emblocados em parafina. Secções foram montadas em lâminas pré-tratadas com silane. Após exposição antigênica e bloqueio de peroxidase endógena, foi realizada incubação com anticorpo primário polivalente (Probac) a 37°C por 2 h, na diluição de 1:2000. A incubação com anticorpo secundário foi feita com *EnVision-Dual link* (DAKO), seguindo as especificações do fabricante. A revelação foi feita com a diaminobenzidina. As avaliações de cada ave foram realizadas com microscopia óptica sob o aumento de 200X. Tais análises consistiram na quantificação de células positivas em dez campos distintos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises bacteriológicas das aves do grupo CN foram negativas para *Salmonella* spp. no baço, fígado, duodeno e ceco, entretanto observamos algumas células positivas na imuno-histoquímica (Tabela 1) no baço e no fígado de todas as aves do grupo CN, indicando contaminação nessas aves. As aves dos grupos infectados, tanto grupo SH e o grupo ST, apresentaram positividade nas análises bacteriológicas e imuno-histoquímicas em vários tecidos; sendo que o ceco foi o tecido que apresentou positividade em ambas análises para todas as aves dos dois grupos infectados. Na comparação da imuno-histoquímica com a bacteriologia (Tabela 1) das amostras, nota-se que o grupo SH apresentou diferenças em relação aos órgãos duodeno, de dois animais e baço, de um animal, onde na bacteriologia mostraram-se negativos e na imuno-histoquímica positivos. Os órgãos fígado e ceco apresentaram semelhança nos testes. Em relação ao grupo ST em alguns tecidos a análise bacteriológica foi negativa e a imuno-histoquímica foi positiva. As células que apresentam essa positividade, na grande maioria das vezes, são macrófagos. Essas células são capazes de fagocitar a *Salmonella* e prevenir sua multiplicação por meio

de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; bem como essa presença no interior dos macrófagos pode caracterizar um estado de portador assintomático (Figura 1). Uma característica da salmonelose aviária é a infecção persistente ou estado de portador. O transporte intestinal pode ocorrer por vários meses após a infecção com determinados sorovares, tais como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, enquanto sorovares hospedeiro-específico aviário, como *S. Pullorum*, podem persistir em números baixos no interior dos macrófagos no fígado e baço por toda a vida do animal. Esta persistência é em face de uma resposta imune substancial exigindo a evasão ou a modulação da resposta pela bactéria (6).

CONCLUSÕES

Ambos os protocolos avaliados produziram resultados complementares; isto é, os resultados positivos observados nas análises bacteriológicas também foram obtidos nas análises de imuno-histoquímica. No entanto, alguns tecidos que foram negativos nas análises bacteriológicas apresentaram uma discreta positividade nas análises de imuno-histoquímica. Sendo que as células que apresentavam essa positividade eram macrófagos. Portanto, na comparação da análise bacteriológica com a imuno-histoquímica, notou-se uma sensibilidade maior na imuno-histoquímica, indicando que esta análise representa uma abordagem adequada e refinada para essa avaliação. Assim, foi possível detectar o patógeno em pequena quantidade, mas relevante para o estudo.

REFERÊNCIAS

1. Barrow PA, Jones MA, Smith AL, Wigley P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathol.**,41,413-420, 2012.
2. Beal RK, Powers C, Wigley P, Barrow PA, Smith AL. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Avian Pathol**, 33,2-33, 2004.
3. Hansen-Wester I; Hensel M *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, 3, 549-559, 2001.
4. Liebler-Tenorio EM, Pabst R. MALT structure and function in farm animals. **Vet. Res.**, 37, 257-280, 2006.
5. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
6. Wigley P, Berchieri A, Page KL, Smith AL, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. **Infect Immun**. 69, 7873-9, 2001.

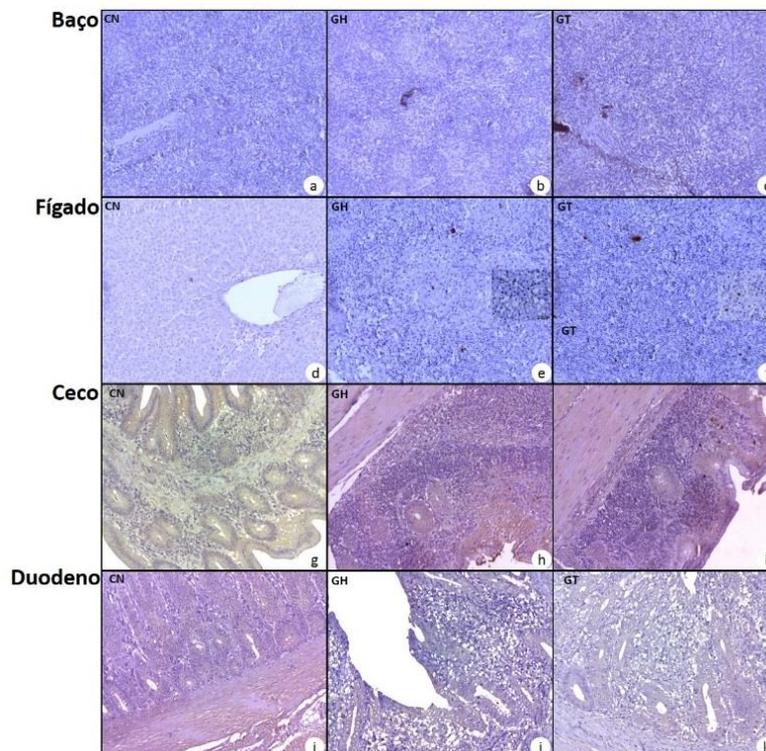


Figura 1. Imagens representativas da marcação para *Salmonella* spp. em baço, fígado, ceco e duodeno de aves dos grupos controle negativo (a, d, g, i), grupo Heidelberg (b, e, h, j) e grupo Typhimurium (c, f, i, k) com 7d.p.i (n = 5 por grupo). Aumento original, X200.

Tabela 1. Comparação entre análises bacteriológica e imuno-histoquímica nos tecidos das aves controle e contaminadas com salmonelas.

Animal	GRUPO CN – CONTROLE NEGATIVO								GRUPO SH – S. HEIDELBERG								GRUPO ST – S. TYPHIMURIUM							
	Duodeno		Ceco		Baço		Fígado		Duodeno		Ceco		Baço		Fígado		Duodeno		Ceco		Baço		Fígado	
	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH	Bac	IMH
1	NEG	-	NEG	-	NEG	+	NEG	+	NEG	+	POS	++	NEG	+	NEG	+	NEG	-	POS	++	NEG	+++	POS	++
2	NEG	-	NEG	-	NEG	+	NEG	+	POS	+++	POS	++++	POS	++	POS	+	NEG	++	POS	++	POS	+	POS	+
3	NEG	-	NEG	-	NEG	+	NEG	+	POS	+	POS	+++	POS	+++	POS	+	NEG	+	POS	+	POS	++	POS	+++
4	NEG	-	NEG	-	NEG	+	NEG	+	POS	+	POS	+	POS	+	POS	+	POS	++	POS	++	POS	+	NEG	+
5	NEG	+	NEG	+	NEG	+	NEG	+	NEG	+	POS	+++	POS	+	POS	-	NEG	-	POS	+	POS	+	POS	+

BAC: análise bacteriológica

IMH: imuno-histoquímica